

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

H₂N-CHRCOOH in which R is an aliphatic, aromatic or heterocyclic gp. and is e.g. ala, val, leu, ser, thre, cys, methionine, pro, lys, arg, his, glutamic acid, glu, aspartic acid, asp, phenyl, tyr, tryptophan, norvaline, norleucine, ornithine, 2,4-diaminobutyric acid, alpha-aminobutyric acid, pref. isoleucine each in L configuration, alpha-aminosibutyric acid and in the cases of trifunctional aminoacids, the cores. N or C omega or O or D substd. derivs. are in the L-config., esp. N omega-acyl, C omega or D-benzylamino acids; or A = an alpha- iminocarboxylic acid of structure (a), where n = 2,3 or 4 and is e.g. L-acetidine-2-carboxylic acid, L-proline, L-pipecolic acid and related cpds. such as L-3,4-dehydroproline, L-thiopropine and the corresp. halo-, NO₂, OH-, CN- lower opt. branched alkyl or alkoxy-substd. derivs. e.g. L-4-hydroxyproline; B = special heterocyclic amines or heterocyclic aminaldehydes; X = an alpha- amino protecting gp. conventionally used in peptide chemistry, pref. tert. butoxycarbonyl; Z = a side chain protecting gp. (depending on the structure of the trifunctional aminoacid) of the tert. butyl type (tert. butyloxycarbonyl, tert. butyl ester, O or S-tert butyl); X = OH, active ester pref. pentafluorophenyl or N-hydroxysuccinimide active ester pref. pentafluorophenyl or N-hydroxysuccinimide ester.

Title Terms: INHIBIT; DI; PEPTIDYL; PEPTIDASE; IV; CONSIST; AMINOACID;

AMIDE; ISOLEUCINE; PYRROLIDE; THIAZIDE; PROLINOL; THIO; PROLINOL

Derwent Class: B05

International Patent Class (Additional): C07D-277/04; C07D-295/04;

C07D-403/02; C07D-409/02; C12N-009/99

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-D01; B07-H; B12-F04; B12-F05; B12-G01B3;

B12-G07; B12-H02; B12-H04; B12-K04A

Chemical Fragment Codes (M2):

01 D010 D011 D020 D601 F011 F012 F013 F014 F019 F400 F410 F423 F433
F499 F511 F513 F521 F553 F599 F610 F653 F710 G001 G010 G011 G100 H1
H100 H101 H181 H182 H2 H211 H321 H341 H401 H421 H441 H442 H481 H498
H521 H541 H581 H598 H600 H621 H641 J0 J011 J012 J271 J3 J371 J372
L142 L250 L463 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222
M231 M232 M233 M240 M271 M280 M281 M312 M313 M314 M315 M321 M331
M333 M340 M342 M343 M349 M371 M373 M381 M391 M412 M413 M414 M416
M510 M511 M521 M522 M530 M531 M540 M720 M903 M904 N231 N241 N261
N331 N361 N511 P526 P616 P813 V814 9217-04301-P 9217-04302-P

Generic Compound Numbers: 9217-04301-P; 9217-04302-P

2/9/2

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008113385

WPI Acc No: 1990-000386/199001

XRAM Acc No: C90-000177

XRPX Acc No: N90-000215

Dipeptidyl peptidase IV colorimetric determ. - using e.g. glycol- or
alanyl-L-proline hydrazide as substrate and p-dimethylamino-benzaldehyde
as colour reagent

Patent Assignee: LUTHER-UNIV HALLE (UYHA-N)

Inventor: BARTH A; BORN I; NEUBERT K; REICHELT D; REICHELT I

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week

B2

DD 270382 A 19890726 DD 295789 A 19861031 199001 B

Priority Applications (No Type Date): DD 295789 A 19861031

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 270382	A		4		

Abstract (Basic): DD 270382 A

In a new procedure for the colorimetric determination of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) in human and animal material, a substrate of the formula R-Pro-NH-NH₂ (I) (where is a proteinogenic amino acid), pref glycyl-L-proline hydrazide or L-alanyl-L-proline hydrazide, is used which is specifically cleaved by DP IV at pH 7.0-10.0 to give R-Pro (II) and hydrazine, and the enzymatically released hydrazine is reacted with p-dimethylamino-benzaldehyde (III) in alcoholic HCl soln with simultaneous termination of the enzymatic reaction to give a dye which is then determined colorimetrically.

USE/ADVANTAGE - Determination of DP IV (EC 3.4.14.5) in body fluids as a marker for Tm lymphocytes in the differential diagnosis of diseases with lymphocytic reaction and of immunodeficiency syndromes due to various causes (eg AIDS). Determination of DP IV is also of use in basic biotechnological research in the analysis of enzyme kinetic problems and of proteolytic processes involving the release of degradation of pharmacologically and physiologically active peptides. Simple, automatable procedure suitable for use in any medical laboratory.

O/O

Title Terms: DI; PEPTIDYL; PEPTIDASE; IV; COLORIMETRIC; DETERMINE; GLYCOL; ALANYL; PROLINE; HYDRAZIDE; SUBSTRATE; P; DI; METHYLAMINO; BENZALDEHYDE; COLOUR; REAGENT

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Additional): C12Q-001/36; G01N-033/52

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C3; B10-A19; B10-B04A; B11-C07B1; B12-K04A2; B12-K04A4; D05-H09

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E04; S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

03 M423 M750 M903 N102 Q233 V802 V814

05 M423 M760 M903 N102 Q233 V600 V614

Chemical Fragment Codes (M2):

01 F011 F012 F423 H1 H100 H181 H2 H211 J0 J012 J3 J311 J371 K0 K6 K620
M280 M311 M312 M321 M331 M340 M342 M349 M381 M391 M413 M430 M510
M521 M530 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 9001-02301-D
9001-02301-M

02 G013 G100 H1 H103 H141 J4 J431 M210 M211 M273 M282 M320 M414 M430
M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 R00699-D
R00699-M

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M903 P831 Q233 Q505 R309 R514 R611 R623 R627 R632

Specific Compound Numbers: R00699-D; R00699-M

Generic Compound Numbers: 9001-02301-D; 9001-02301-M

2/9/3

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

B2

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 270 382 A1

 4(51) G 01 N 33/52
 G 01 N 33/68
 C 12 G 1/66

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPG 01 N / 295 789 5

(22) 31.10.86

(44) 26.07.89

 (71) Martin-Luther-Universität Halle – Wittenberg, Sektion Biowissenschaften, Domplatz 1, Halle, 4020, DD
 (72) Neubert, Klaus, Dr. Dipl.-Chem.; Barth, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Reichelt, Dieter, Dr. Dipl.-Chem.; Reichelt, Ingrid; Born, Egon, Dr. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV mittels Dipeptidhydraziden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV), das dadurch gekennzeichnet ist, daß vorzugsweise das Substrat Glycyl-L-Prolin-hydrazid die Bestimmung von Aktivitäten der DP IV sowohl mit einer manuellen Zweipunktmethode als auch mit einem automatisiertem Verfahren nach dem „flow stream“-Prinzip mit hoher Spezifität und analytischer sowie diagnostischer Sensitivität ermöglicht. Das vorzugsweise eingesetzte Substrat Glycyl-L-Prolin-Hydrazid wird durch DP IV in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 10,0 spezifisch zu: Glycyl-L-Prolin und Hydrazin gespalten. Letzteres wird mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholisch-saizsaurer Lösung zu einem Farbstoff umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt. Die Erfindung ist für die theoretische methodische und klinische Enzymologie und für die medizinische Diagnostik und Verlaufsbeobachtung spezieller Krankheiten, wie z. B. bestimmter Krebserkrankungen und Immunmangelsyndrome von Bedeutung.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) in menschlichem und tierischem Untersuchungsmaterial, gekennzeichnet dadurch, daß zur Bestimmung ein Substrat der Formel $R-Pro-NH-NH_2$, worin R für eine proteinogene Aminosäure steht, vorzugsweise aber Glycyl-L-Prolin-hydrazid oder L-Alanyl-L-Prolin-hydrazid eingesetzt wird, das durch DP IV in einem pH-Bereich von 7,0–10,0 spezifisch zu R-Pro (R in der obigen Definition), vorzugsweise aber zu Glycyl-L-Prolin bzw. L-Alanyl-L-Prolin und Hydrazin gespalten wird und das enzymatisch freigesetzte Hydrazin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholischer salzsaurer Lösung unter gleichzeitigem Abbruch der Enzymreaktion zu einem Farbstoff umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das entsprechende Substrat der Formel $R-Pro-NH-NH_2$, worin R für eine proteinogene Aminosäure, vorzugsweise für Glycin oder L-Alanin, steht, aus $Y-R-Pro-X$, worin R wie oben definiert ist, X für eine Estergruppierung, vorzugsweise Methyl-, Ethyl-, Benzyl- oder Phenacyl-ester und Y für Benzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropylloxycarbonyl, α,α' -Dimethylbenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl oder vorzugsweise tert. Butyloxycarbonyl stehen, aufgebaut, durch Verknüpfung von $Y-R-OH$ mit $Pro-X$ nach den in der Peptidchemie üblichen Techniken durch Hydrazinolyse und anschließender acidolytischer oder hydrogäolytischer Abspaltung des Restes Y nach den in der Peptidchemie für diese Aminoschutzgruppen üblichen Deblockierungsbedingungen erhalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß das jeweils verwendete Substrat in Form eines Salzes, vorzugsweise als Dihydrochlorid eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß sowohl eine Vorfeld- und Differentialdiagnostik als auch eine Verlaufs- und Therapiekontrolle von Krankheiten, vorzugsweise bestimmter maligner Erkrankungen und Immunmangelsyndrome, wie z.B. AIDS, nach einem einfachen Verfahren möglich ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) (Ec 3.4.14.5) in menschlichem und tierischem Untersuchungsmaterial zur Lösung biochemisch-wissenschaftlicher und medizinisch-diagnostischer Aufgaben.

Die Bestimmung von DP IV-Aktivitäten in Körperflüssigkeiten vornehmlich als Marker für T_H-Lymphozyten gewinnt zunehmend an Bedeutung in der enzymologischen Differentialdiagnostik von Erkrankungen mit lymphozytärer Reaktion und von Immunmangelsyndromen verschiedener Ätiopathogenese.

Die Anwendung der DP IV in der biochemischen Grundlagenforschung betrifft die Abklärung enzymkinetischer Probleme und die Stellung des Enzyms innerhalb proteolytischer Prozesse unter Freisetzung oder Abbau pharmakologisch und physiologisch aktiver Peptide.

Die Erfindung ist damit für die biochemischen und medizinischen Wissenschaften, für Forschung und medizinische Betreuung, für Diagnostik und Therapiekontrolle von Interesse und Bedeutung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Bestimmung von Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV wurden bisher ausschließlich Methoden auf der Grundlage der Substrate Glycyl-L-Prolin-4-nitroanilid, L-Alanyl-L-Prolin-4-nitroanilid bzw. der entsprechenden β -Naphthylamide und Coumarinamide eingesetzt (M. Harada et al. Biochim. Biophys. Acta 705, 288 [1982], Biochim. Biophys. Acta 576, 280 [1979], K. Imai et al. J. Biochem. [Tokyo] 93, 431 [1983]). Die Verfahren mit Verwendung dieser Substrate haben Nachteile:

- Die Methode unter Verwendung von Gly-Pro-p-nitroanilid besitzt aufgrund des vergleichsweise niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten der enzymatisch freigesetzten und zu bestimmenden chromogenen Komponente p-Nitroanilin eine geringe analytische und dadurch bedingte eingeschränkte diagnostische Sensitivität.
- Alle bisherigen Verfahren erfordern Photometer mit kinetischer Registrierung und sind daher aufgrund der damit verbundenen Investitionskosten nicht in allen medizinischen Laboratorien unter ökonomischen Aspekten praktikabel. Dieser Aspekt gewinnt besondere Relevanz bei Einsatz des Verfahrens in der Vorfelddiagnostik.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung einer einfachen manuellen bzw. nach dem Fließsystem automatisierbaren und in allen medizinischen Laboratorien praktikablen kolorimetrischen Methode zur einzelnen und massenweisen Bestimmung von Aktivitäten der DP IV in Körperflüssigkeiten zur Früherkennung, Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle von bestimmten Erkrankungen mit Störungen im Immunsystem mit höherer diagnostischer Sensitivität.

Die Erfindung ist vorzugsweise gedacht als Massen-Screening-Verfahren zur enzymologischen Erfassung von Immunmangelsyndromen, insbesondere von Acquired immuno = deficiency syndrome (AIDS). Die Erfindung dient damit der Erfindung v n Qualität und Wirksamkeit in der medizinischen Betreuung in ihrer Einheit von Prophylaxe, Diagnostik und Therapie und besitzt damit hohe gesundheitspolitische Bedeutung.

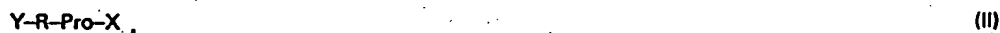
Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für die kolorimetrische Bestimmung von DP IV Substrate zu entwickeln, welche mit hoher enzymatischer Spezifität und analytischer und diagnostischer Sensitivität die Ermittlung der Enzymaktivitäten mittels einfacher Methodik unter Verwendung einer photometrischen Grundausstattung in allen medizinischen Laboratorien bzw. mit einem automatisierten Verfahren nach dem „flow-stream“-Prinzip bei Massenuntersuchungen gestattet. Erfindungsgemäß wird zur Bestimmung der DP IV-Aktivität ein Substrat der Formel I



wobei R für eine proteinogene Aminosäure steht, vorzugsweise aber Glycyl-L-Prolin-hydrazid oder L-Alanyl-L-Prolinhydrazid, eingesetzt.

Ihre Darstellung ist dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel II



worin R für eine proteinogene Aminosäure, vorzugsweise für Glycin- oder L-Alanin, X für eine Estergruppierung bevorzugt Methyl-, Ethyl-, Benzyl- oder Phenacyl-ester und Y für Benzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropylloxycarbonyl, α, α' -Dimethylbenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl oder vorzugsweise für tert. Butyloxycarbonyl stehen durch Verknüpfung von Y-R-OH mit H-Pro-X nach den in der Peptidchemie üblichen Techniken, vorzugsweise nach der Mischanhydrid-Methoda mittels Chlorkohlensäureisobutylester aufbaut, durch Umsetzung mit alkoholischer Hydrazinlösung in Verbindungen der Formel III



mit R und Y in der obigen Definition überführt, aus denen man durch acidolytische oder hydrogenolytische Abspaltung des Restes Y nach den in der Peptidchemie für diese Aminoschutzgruppen üblichen Deblockierungsbedingungen das entsprechende Substrat gemäß Formel I erhält, das vorzugsweise als Salz insbesondere als Dihydrochlorid für die kolorimetrische DP IV-Bestimmung eingesetzt wird.

Das entsprechende erfindungsgemäß dargestellte Substrat entsprechend Formel I zeichnet sich dadurch aus, daß es durch DP IV zu R-Pro (R steht für eine proteinogene Aminosäure), vorzugsweise aber Gly-Pro oder Ala-Pro und Hydrazin in einem pH-Bereich von 7,0 bis 10,0, vorzugsweise zwischen 7,5 und 8,5 gespalten wird, wobei das enzymatisch freigesetzte Hydrazin bei Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholischer salzsaurer Lösung unter gleichzeitigem Abbruch der Enzymreaktion zu einem orangeroten Farbsalz umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt wird.

Die bei 455 nm gemessene Extinktion des Farbstoffes ist der DP IV-Aktivität direkt proportional.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen erläutert.

Abkürzungen für Aminosäure- und Peptidderivate entsprechend IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. Biol. Chem. 247, 977 (1972).

1. Darstellung von Glycyl-L-prolin-hydrazid · 2 Hydrochlorid

8,8 g tert. Butyloxycarbonyl (Boc)-glycin in 50 ml Tetrahydrofuran werden bei -15°C unter Rühren nacheinander mit 6,4 ml N-Methylmorpholin und 6,5 ml Chlorkohlensäureisobutylester versetzt und nach 8 Minuten 6,4 ml N-Methylmorpholin und sofort danach 8,3 g L-Prolin-methylester · hydrochlorid in 30 ml Tetrahydrofuran und einigen Tropfen Wasser hinzugefügt. Der Ansatz wird 1 Stunde bei -15°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach dampft man das Lösungsmittel i. Vak. ein, löst den Rückstand in Essigester, wäscht nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung, Wasser, 5%iger KHSO_4 -Lösung und Wasser. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und der Essigester i. Vak. verdampft. Es werden 11,2 g Boc-Gly-Pro-methylester erhalten. Der geschützte Dipeptidmethylester wird in 50 ml Ethanol gelöst und mit 10 ml Hydrazinhydrat versetzt.

Nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur läßt man das Lösungsmittel i. Vak. verdampfen. Das erhaltene Produkt Boc-Gly-Pro-NH-NH₂ wird mit Ether verrieben, abgesaugt, sorgfältig im Hochvakuum über Schwefelsäure getrocknet (Schmp. 183 bis 187°C), $[\alpha]_D^{25} = -63,6^\circ$ (c = 0,5 in Methanol) und zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 120 ml 1,1 n HCl in Essigsäure behandelt. Der Ansatz wird i. Vak. eingeeengt, der Rückstand mit Ether verrieben, abgesaugt und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 10,7 g (60 % d. Th.)

Schmp. $198-201^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25} = -68,6^\circ$ (c = 0,5 in Methanol)

Dünnschichtchromatographisch einheitlich auf Kieselgelfolie Silufol UV₂₅₄, ČSSR, in 1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (30:20:6:24), 1-Butanol-Essigsäure-Wasser-Essigester (20:20:20:20) und 2-Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:13,5:11,5)

2. Kolorimetrische Bestimmung der DP IV-Aktivität

0,500 ml Substrat-Puffer-Gemisch, bestehend aus 16,32 mmol/l Gly-Pro-Hydrazid · 2 HCl in Diäthanolamin-HCl-Puffer (200 mm l/l) v m pH 9,1, werden auf 37°C temperiert und mit 0,020 ml Serum für eine Zeit v n 15 min inkubiert. Nach der Inkubation werden 5,00 ml Farbreagens, bestehend aus 1 Volumenanteil einer Lösung v n 4 g Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 96%igem Ethanol oder Methanol und 17 Volumenteilen 0,1 N Salzsäure, zugegeben und die Ansätze nach 30 min Farbentwicklung bei 455 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Dieser Leerwert wird wie folgt behandelt. 0,500 ml des Substrat-Puffer-Gemisches werden 15 min bei 37°C inkubiert, danach mit 5,00 ml Farbreagens und anschließend mit 0,020 ml Serum versetzt.

Aus den Extinktionsdifferenzen wird über einen Hydrazin-Vergleichsansatz oder den molaren Extinktionskoeffizienten die Enzymaktivität in nmol/(s · l) errechnet.

CUSTOMER ORDER DOCUMENT - THIS IS NOT AN INVOICE (but may accompany one)

Your invoice will reference this order by Order Number, your Docket/Ref#, and date.

Order Number: 123795
 Order Date: 12/13/1996
 Customer Docket/Ref: io248/9000
 Shipping mode: O

ATTN OF: ROBIN PLUMMER
 WOLF, GREENFIELD & SACKS, PC
 FEDERAL RESERVE PLAZA, 600 ATLANTIC AVE
 BOSTON , MA 02210

PHONE: 617-720-3500 FAX: 617-720-2441

(Please notify us if any of the above information is incorrect)

ODB24	5543396	1	3.00
ODB24	5462928	1	3.00
ODB24	5554728	1	3.00
ODB24	5093477	1	3.00
OPT	DD 270382**	1	5.00
OFR	WO 95/29190	1	15.00
OFR	WO 95/15309	1	15.00
OFR	WO 95/12618	1	15.25
OFR	WO 94/28915	1	21.50
OFR	WO 94/03055	1	15.00

Shipping and handling: \$ 43.20

TOTAL COST OF THIS ORDER: \$ 141.95